

## 第五章 組換え体の作製

比 嘉 昭 子

第四章で組換えDNAを作る方法を実験を通して学んだ。要約すると、目的の遺伝子（ここでは大腸菌の染色体DNAを用いた）とプラスミド（pBR 322）を同じ制限酵素で切断して混合し、酵素（リガーゼ）でつないで環状のDNA分子を作った。そこで述べたように、このDNAを役立てるには、細胞の中に移入して組換え体を持つ細胞を増殖させなければならない。ここではその方法について述べる。

### <はじめに>

細胞に、外から遺伝子（外来遺伝子）が侵入する現象は、自然界でしばしば観察される。その一例は、ウイルスによって遺伝子が持ち込まれる（形質導入）ことである。細菌の場合、その他に菌と菌が接触して遺伝子が一方の菌から他方の菌へ移動（接合）したりDNA自体が侵入したりする（形質転換）。こうして侵入した遺伝子が安定に存在し続けるのは、外来遺伝子が自律増殖因子を持っている（ウイルス、プラスミド）か、それが細胞の染色体遺伝子に組み込まれる場合である。これらの現象が、全ての種類の細菌でも起こるわけではない。遺伝や生化学の研究にもっともよく使用された大腸菌は、十数年前まで形質転換させることができなかったが、現在では、簡単な操作で形質転換させることが可能になったので、遺伝子操作に大腸菌がよく使用される。

全く異なる生物種の遺伝子でも、細菌の自律増殖因子と組み合わせれば細菌遺伝子の一員として増殖して安定に存続する。ただ、外来の遺伝子は存続しても、その情報が転写され、翻訳されて目的のタンパク質が合成されるとは限らない。そのためには、また一工夫が必要なことが多い。

### 1) 大腸菌の形質転換の概要

菌をある培養液に植えてしばらくすると、菌は、その培地の最適の速度で、

2倍、4倍、8倍と $2^n$ で増殖する（この期間を対数的増殖期という）が、ある濃度（約 $10^9$  ml）に達すると速度は落ち、やがて増殖が止まってしまう。この対数的増殖期の終りに近い菌を集めて、低温で塩化カルシウム溶液の中に短期間浸しておくと、菌の透過性が増加して高分子のDNAが侵入できるようになる。このような状態になった細胞は、DNAを受入れるという意味で、受容体（レシピエント）細胞と呼ぶ。

この細胞と精製したDNA（組換えDNAでも、その他のDNAでもよい）を混合して数分、40℃前後に加熱すると、DNAは受容体に入る。そこでこの菌を普通の培地に戻すと元の状態に修復して増殖する。どういう理由か明らかでないが実際に受容体となる菌はごく一部で、例えば百万個（ $10^6$ 個）に一個の割合である。しかし、数十億個の菌を扱うのは簡単であるから、たやすく数千個の形質転換菌が得られる。従って目的の遺伝子を持つものだけを増殖させれば多量の目的物を手にすることができる。

前回作製した組換えDNAを用いて形質転換する時には、受容体としてテトラサイクリンにもアンピシリンにも感受性（ $Amp^S$ ,  $Tet^S$ ）の菌を使うと、形質転換菌を選ぶのに都合がいい。何故ならpBR 322は、 $Amp^R$ ,  $Tet^R$ なので（図-1）、pBR 322やpBR 322と染色体DNAを、制限酵素Bam HIで切断して作った組換え遺伝子で形質転換された菌は、 $Amp^R$ になるのでアンピシリンを入れた平板培地にばらばらにまいて培養すると、転換菌だけが増殖してコロニーを作る。この中でpBR322DNAで転換されたものと、組換え遺伝子で転換されたものを区別するには、各コロニーがテトラサイクリンに耐性があるかどうかを調べればよい。アンピシリンに耐性でテトラサイクリンに感受性の菌は、組換え遺伝子で形質転換されたものである（図-1）。それらには染色体DNAの様々な遺伝子が入っているので、充分な数を集めたのが染色体DNAの遺伝子図書館である。今、仮に受容体が $His^-$ で染色体DNAが $His^+$ とすると、形質転換菌の中でヒスチジンを含まない培地にコロニーを作るのはヒスチジンの遺伝子を含む組換え遺伝子による形質転換菌である。

その他、特定の遺伝子を同定するにはもっと複雑な手段によらねばならないことが多いが、それについては他の機会に譲ることにする。では実験を通して学ぶこととしよう。

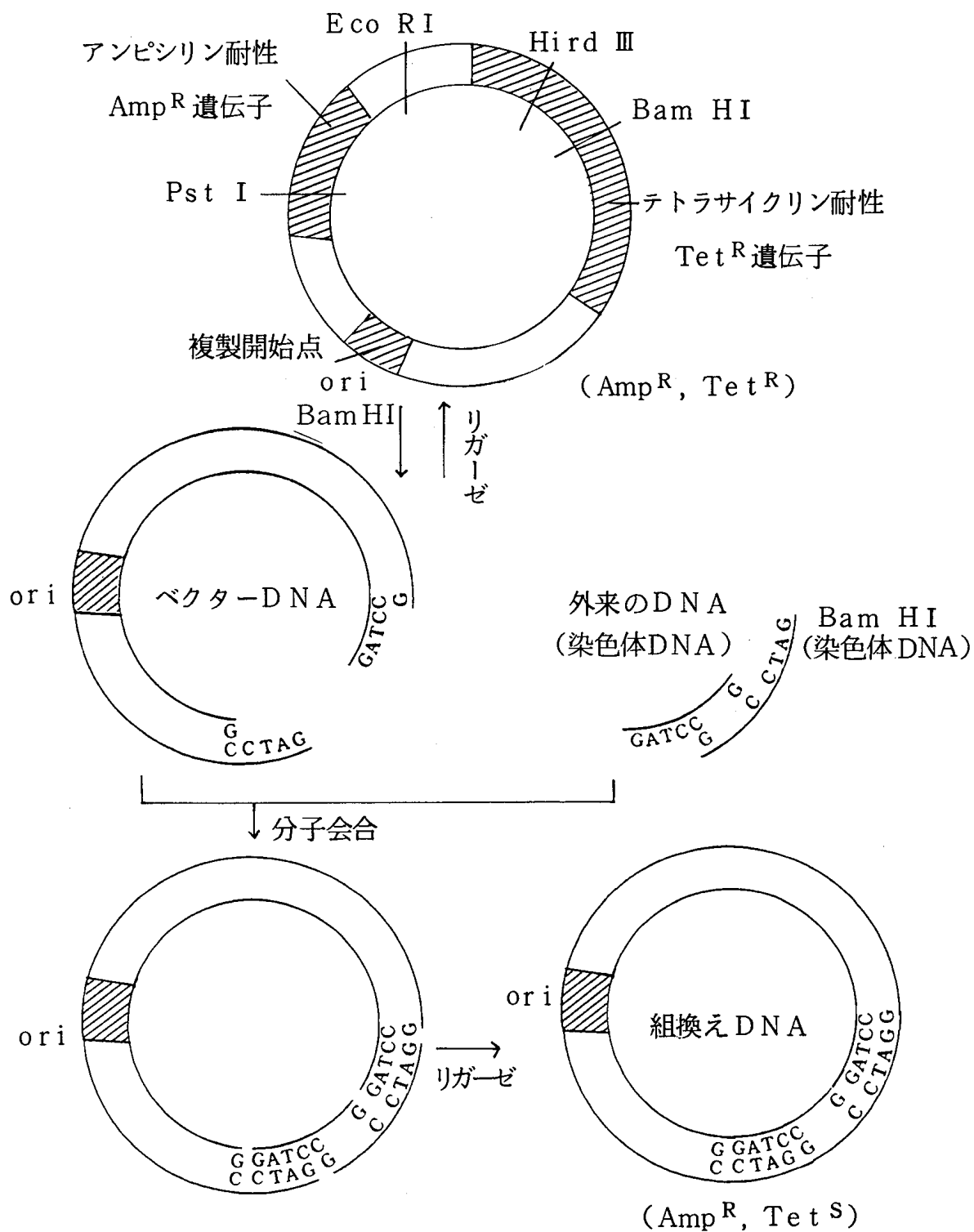


図-1: Bam HI で切断された pBR322 と外来DNA の組換え

## 2) 形質転換の実験

実験 1～3 では、大腸菌にDNAを入れる一般的な方法を述べ、実験 4, 5 では第四章で作成した組換えDNAを使用しての形質転換実験について記述する。

### 実験－ 1. 受容体細胞<sup>\*</sup> の作成

#### \* 受容体細胞

受容体作成法は、細菌の種類によって異なることがある。同じ大腸菌を取り扱うときにも、細い点で様々な変法があるが、大筋ではほとんどこの方法である。

誤って試験管の外へ出た時、簡単に死滅してしまうような菌を、受容体として使用して、組換え体が環境の中に広がるのを防ぐようにしている。

栄養要求性を示す菌や紫外線に弱い菌等が、しばしば受容体として用いられる。

保存用培地<sup>\*</sup> にはえている大腸菌を、火炎で熱した白金耳<sup>\*</sup> でかきとり、平板培地上で分離した後、さらにその1つのコロニーを5 mlの培養液に植えて37℃で一晩培養する。

#### \* 保存用培地

菌はいろいろな方法で保存されるが、使用する前に平板培地に分離したコロニーを作り、それをかきとって一晩培地を作る。

#### \* 白金耳

白金線の先に、直径約1 mmの輪を作ったもの。火炎で赤熱して滅菌するので、冷えてから菌をかきとる。

この一晩培養液を、新鮮な培地に約2%容積加え、37℃で再培養する。このとき菌の増殖の状態を知るために、2～30分毎に培養液の一部を取り、分光光度計で、その濁度<sup>\*</sup> を550nmの吸収で測定する。

＊濁度

大腸菌は550nm付近の光を散乱するので、ある濃度範囲では単位体積あたりの菌数と吸光度が比例関係にある。従ってあらかじめ菌の濃度を、550nmの吸光度との関係を調べておけば、吸光度で菌濃度を知ることができる。

吸光度 ( $A_{550nm}$ ) が  $0.6^*$  になった時、培養を停止して氷の中で充分冷却してから低温で集菌する。

＊  $A_{550nm} = 0.6$  での菌数は、約  $2 \sim 3 \times 10^8 / ml$  である。

上清をできるだけ除去してから、あらかじめ氷冷しておいた50 mM 塩化カルシウムを含む pH 8 の10 mM トリス<sup>\*</sup> 緩衝液を元の培養液の1 / 2容積加え、菌を懸濁して30分氷冷しておく。

＊トリス

トリスー〔ヒドロキシメチル〕ーアミノメタンという化合物の略称で、生化学実験の緩衝液によく使用される。pH7～9で緩衝作用がある。

30分後再度冷却遠心して上清を捨て、再び前回と同じ緩衝液に菌を懸濁するが、このとき使用する量は元の培養液の約1 / 15容積で、これを受容体細胞として使用する。

実験－2. 受容体細胞へDNAの挿入

受容体細胞を0.2 ml冷却したピペットで氷の中の小試験管に移し、これにDNA溶液を加える。DNA溶液の体積は0.1 ml以下で、その中に0.1  $\mu g$  以下<sup>\*</sup> のDNAを含むようにする。

＊ DNAの濃度が濃過ぎると、形質転換の効率が落ちる。

30分間水中においた後、42℃の恒温水槽で2分間暖める。この加熱は、DNAが細胞に侵入するのに必要だと考えられている。次に、栄養を十分に含んだ液体培地を、1 ml加えて37℃で約1時間保温して、カルシウムイオンで透過性を増した細胞が、正常の状態に修復されて増殖できるようにする。

### 実験－3. 形質転換菌の培養

#### 〔選択固体培地の作成〕

あらかじめ形質転換菌だけが成長する平板培地を作っておかねばならないが、それは使用したDNAによって異なる。仮に物質Aの入った培地では、形質転換した菌だけが成長して他は死滅してしまうとすると、物質Aを含む平板培地を作ればよい。平板培地は直径9 cmのシャーレ\*に入っているため、その上で一個一個の菌が分離独立したコロニーを作るようにするためには、約100個以下の菌を均一にばらまかねばならない。

#### \*シャーレ

直径約9 cm、高さ約1.5 cmの円形の蓋付きのガラス又はプラスチックの容器。

受容体が形質転換される確率を約 $10^{-6}$ とし、0.1 mlの中に $10^8$ 個の受容体があるとすると、この中には100個の形質転換菌が入っていることになる。従って、この場合は希釈しないでそのまま0.1 mlを平板培地にまいて37℃で一昼夜保温すれば、一個一個分離したコロニーができるはずである。そのそれぞれは一個の形質転換細胞由来のものである。

### 実験－4. 大腸菌の染色体DNA遺伝子図書館の作製

第四章で作製した組換えDNA分子を、受容体に入れて形質転換菌を選択する。この組換えDNA分子はプラスミドpBR 322と、染色体DNAを制限酵素Bam HIで切断したものを混合し、リガーゼで結合したものである。こ

の標品には、いろいろな染色体遺伝子がプラスミドのテトラサイクリン遺伝子の位置に挿入されたものの他に、元のプラスミドに戻ったのも混合しているが、そのままDNA標品として用いることにする。

図-1で分るように、pBR322をBam HIで切ると、テトラサイクリン耐性の遺伝子が破壊されるので、組換え遺伝子はテトラサイクリンに耐性を持たない。実験-1で作製した受容体菌に、実験-2の要領でこのDNAを挿入する。これをアンピシリンを含んだ平板培地にまいて一晩培養すると、いくつかのコロニーができるが、これらは、ほとんど全てAmp<sup>R</sup>の形質転換細胞である。この中にはTet<sup>R</sup>のpBR322とTet<sup>S</sup>の組換え遺伝子によるものとが混合している。そこでこれらを区別するために、二枚の平板培地を用意する。その一枚にはアンピシリンを、他の一枚にはテトラサイクリンを入れる。これらを縦横に区切って番号を付けた同一の紙の上にのせ、両方の平板培地のシャーレの底の一箇所に、目印を付して紙の番号の位置との関係が分るようにしておく。先にアンピシリン含有の平板培地で選択した形質転換細胞のコロニーのひとつを滅菌した妻揚枝で軽く触れてから、その妻揚枝で用意した二枚の平板の同じ番号の場所に触れる。つまり、あるコロニーの菌を、両方の培地の同一の部分にうえるのである。これをできるだけ多くのコロニーについて繰り返し行ってから37℃に一晩保温する。

テトラサイクリン平板にはコロニーを作らないものがいくつかある。これらはAmp<sup>R</sup>、Tet<sup>S</sup>の組換えDNAによる形質転換菌であり、両方にコロニーを作ったのは、元のプラスミドによる転換菌である。テトラサイクリン平板にははえなかった菌を、それぞれアンピシリン平板のコロニーから拾って増殖させれば染色体DNAの図書館ができる。このような方法をパッチング法という。

## ま と め

大腸菌を形質転換させて転換菌を選択する方法を，大腸菌の染色体DNA の遺伝子図書館を作ることを例に，実験を通して具体的に記述した。

- 1) 対数増殖後期の菌を集菌・濃縮して低温で30分間，塩化カルシウム溶液につけておくと，透過性が増して，高分子のDNAが侵入できるようになる（受容体の作成）。
- 2) 受容体と，目的のDNAをカルシウムイオン存在下で混合し，2分間42℃に加熱してDNAを入れる（形質転換）。栄養培地を加えて保温して，菌を正常に戻す。
- 3) 形質転換した菌だけが成育するような平板培地にうえて，形質転換菌を選び出す（選択）。



## 練習問題

### 第五章

- (1) プラスミド pBR322 を、制限酵素 Pst I で切断して、同じ酵素で切断した外来 DNA と混合したとする。図-1 を参考にして次の問に答えよ。

問 1 : 組換え体を作るには、どんな酵素を加えなければならないか。

問 2 : 組換え体が大腸菌にいれるには、菌にどんな処理をしなければならないか。

問 3 : 形質転換の有無を知るためには、どんな性質を持った菌を使用すればよいか。

問 4 : 形質転換菌の中で組換え体が入ったものと元のプラスミドに戻ったものが入ったものとを区別するにはどうすればよいか。

問 5 : 外来 DNA が His<sup>+</sup> の遺伝子を持つとき、この組換え体が入っているものを選択するにはどうすればよいか。

- (2) 制限酵素 Eco RI, Bam HI, Pst I で切断したプラスミド pBR 322 について、次の問に答えよ。

ただし、この断片に Eco RI の位置から右回りに、1, 2, 3, ……と番号を付すこととする。

問 1 : DNA断片は、いくつできるか。

問 2 : この DNA断片にベクターとして使用できるものがあれば、それはどれか。

問 3 : この DNA断片をアガロース電気泳動で分離したとき、泳動速度の速いものから順に並べよ。

- (3) 次の問に答えよ。

問 1 : 遺伝子図書館とは何か。

問 2 : 外部から侵入した遺伝子が、安定にその細胞内で存在し続けるには、どんな状態でなければならないか。